ПАРАЗИТОЛОГИЯ, III, 4, 1969

УДК 576.895.421

ВЛИЯНИЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ РИККЕТСИЯМИ COXIELLA BURNETI И DERMACENTROXENUS SIBIRICUS НА СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ОРГАНИЗМЕ КЛЕЩА HYALOMMA ASIATICUM

Ю. С. Балашов, А. Б. Дайтер и А. К. Станюкович

Зоологический институт АН СССР и Ленинградский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Методом тонкослойной двухмерной хроматографии в слое силикагеля исследовано содержание свободных аминокислот в гомогенатах голодных имаго *Hyalomma asiaticum*. У клещей, зараженных на нимфальной фазе риккетсиями *Coxiella burneti* и *Dermacentroxenus sibiricus*, обнаружены значительные изменения в концентрациях α-аланина и еще одного не идентифицированного компонента.

Риккетсии — возбудители трансмиссивных инфекций человека и позвоночных животных — могут вызывать патологические изменения и в организме переносчика-членистоногого. К сожалению, в силу недостаточной изученности нормальной физиологии и биохимии кровососущих насекомых и клещей мы можем судить о подобных воздействиях возбудителей на их организм главным образом лишь в случае гибели зараженного переносчика. Примером последнего могут служить взаимоотношения вшей и риккетсий Провачека (Weyer, 1960). В то же время при инфицировании иксодоидных клещей многими видами риккетсий у этих переносчиков обычно не наблюдаются какие-либо существенные отклонения от нормы в продолжительности жизни, сроках развития и способности к размножению (Балашов и Дайтер, 1963, 1965; Дайтер, 1963, 1966; Гроховская и Сидоров, 1967; Коршунова, 1967). Последнее послужило причиной широкого распространения концепции о безвредности риккетсий для клещей или даже о симбиотической природе отношений этих двух групп организмов (Kramer, 1963; Krieg, 1963; Philip, 1963).

Подобная точка зрения, на наш взгляд, требует пересмотра. В силу биологических особенностей самих риккетсий как группы облигатных внутриклеточных паразитов, видимо, следует говорить не о безвредности их для клещей, а о различной степени патогенности для разных видов членистоногих-переносчиков. Результаты исследований клещей-риккетсионосителей с помощью более тонких физиологических методик подкрепляют это положение. Определение интенсивности газообмена у имаго клещей *H. asiaticum*, зараженных *C. burneti* и свободных от возбудителя, позволило выявить различия в интенсивности дыхания между «чистыми» и инфицированными особями (Балашов и Дайтер, 1969). Учитывая, что содержание свободных аминокислот в организме голодных иксодовых клещей отличается высоким постоянством и видовой специфичностью (Micks a. Gibson, 1957; Станюкович, 1966), представляет интерес, не изменяются ли их содержание и состав под влиянием размножения риккетсий в переносчике.

Для исследования были взяты 3 группы голодных имаго *H. asiaticum* из лабораторной культуры. Первая группа включала 120 «чистых» особей, которые, по данным многократных проверок, были свободны от патогенных для позвоночных риккетсий. Из этой группы биохимическому исследованию были подвергнуты 4 партии по 15 самок, весом 224, 231, 232 и 236 мг каждая, и 4 партии по 15 самцов, весом 183, 192, 205 и 214 мг. Нимфы клещей питались за 8 месяцев и перелиняли в имаго за 6.5—7 месяцев до начала опыта.

Вторая группа включала 65 клещей, инфицированных возбудителем лихорадки Ку — *C. burneti*. Клещи были заражены в период нимфального питания на лихорадящих морских свинках, предварительно инфицированных риккетсиями Бернета штамма *Ixodes* III — «Луга» в I фазе. Экспериментально зараженные клещи были разделены на 3 партии по 15 самцов, весом 186, 192 и 206 мг и 2 партии по 10 самок, весом по 130 мг каждая. Биохимическое исследование этих клещей было проведено через 8 месяцев после их заражения и через 6.5—7 месяцев после линьки из нимф.

Третья группа из 90 клещей была заражена при нимфальном кормлении на морских свинках возбудителем клещевого риккетсиоза Северной Азии — *D. sibiricus*. Для заражения был использован штамм, выделенный в 1967 г. А. К. Бочковой и Г. Я. Ценевой из клещей *Dermacentor nuttalli*, собранных в природном очаге этой инфекции в Иркутской обл. Зараженные клещи были разделены на 3 партии по 15 самцов, весом 150, 158 и 164 мг, и 3 партии по 15 самок, весом 159, 170 и 182 мг, и подвергнуты биохимическому исследованию через 8—9 месяцев после инфицирования и 6.5—7.5 месяцев после линьки. Клещей во всех опытах содержали при температуре 26—28° и на всех фазах кормили только на морских свинках.

Риккетсионосительство экспериментально инфицированных клещей было подтверждено положительными результатами их проверок на биопробных животных, а также данными микроскопического изучения внутренних органов в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза, Лейшману, Здродовскому или обработанных специфическими иммунофлуоресцентными сыворотками по Кунсу.

Содержание свободных аминокислот в организме клещей определяли методом двухмерной тонкослойной хроматографии в слое силикагеля КСК на стеклянных пластинках размером 6×9 см (Марченко, 1967). Партии из 10 или 15 клещей, предназначенные для хроматографирования, замораживали жидким азотом и гомогенизировали. Белки осаждали 96% этанолом и удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость высушивали в вакуум-эксикаторе и обезжиривали эфиром. Для разделения аминокислот применяли тройное пропускание пробы в системе хлороформ-метанол-25% аммиак в объемном соотношении 20 г : 12 г : 4 мл. Во втором направлении производили разделение в системе фенол-вода-25% аммиак в пропорции 30 г : 9 г : 1 мл.

Аминокислоты выявляли проявлением хроматограмм 0.02% раствором нингидрина в этаноле. Идентификацию аминокислот на хроматограммах проводили по методу двойного пятна (Carlson, 1961) путем добавления к эталонной пробе стандартных аминокислот.

Для хроматограмм свободных аминокислот гомогенатов, закончивших послелиночное доразвитие имаго *H. asiaticum*, характерно постоянство содержания и взаимного соотношения нингидринположительных пятен. Интенсивность и взаимное расположение этих пятен сохранялось без заметных изменений у особей, различавшихся по срокам голодания в пределах нескольких месяцев, вплоть до появления явных признаков истощения.

В этанольных экстрактах из гомогенатов «чистых» особей постоянно выявлялись 25 нингидринположительных компонентов. Из них 16 пятен были идентифицированы (рис.). Они представлены на хроматограммах следующими пятнами: *3* — аспарагиновая кислота; *4* — глютаминовая кислота, лизин и орнитин; *5* — аргинин; *7* — серии; *8* — глицин; *9* — аспарагин; *10* — β-аланин; *11* — оксипролин; *13* — гистидин; *14* —

треонин; *15* — α-аланин; *19* — тирозин; *21* — валин; *22* — лейцин, изолейцин и метионин; *23* — фенилаланин; *25* — триптофан. Пятна *1*, *2*, *6*, *12*, *16*, *17*, *18*, *20* и *24* остались неидентифицированными. На хроматограммах клещей постоянно отсутствовали пролин, цистеин, цистин, и цистеиновая кислота.

Выявлены отличия в количественном содержании отдельных аминокислот у самцов и самок (рис. *А* и *Б*). На хроматограммах самок размеры пятен α-аланина и компонента *16* примерно одинаковы, тогда как у самцов пятно *16* значительно интенсивнее пятна α-аланина. Неидентифицированное пятно *17* у самок больше пятна *19* (тирозин), а у самцов эти пятна одинакового размера. Интенсивность пятна *5* (аргинин) у самок выше, чем у самцов. Кроме того, у самцов в следовых количествах выявлен аспарагин, а у самок он отсутствовал.

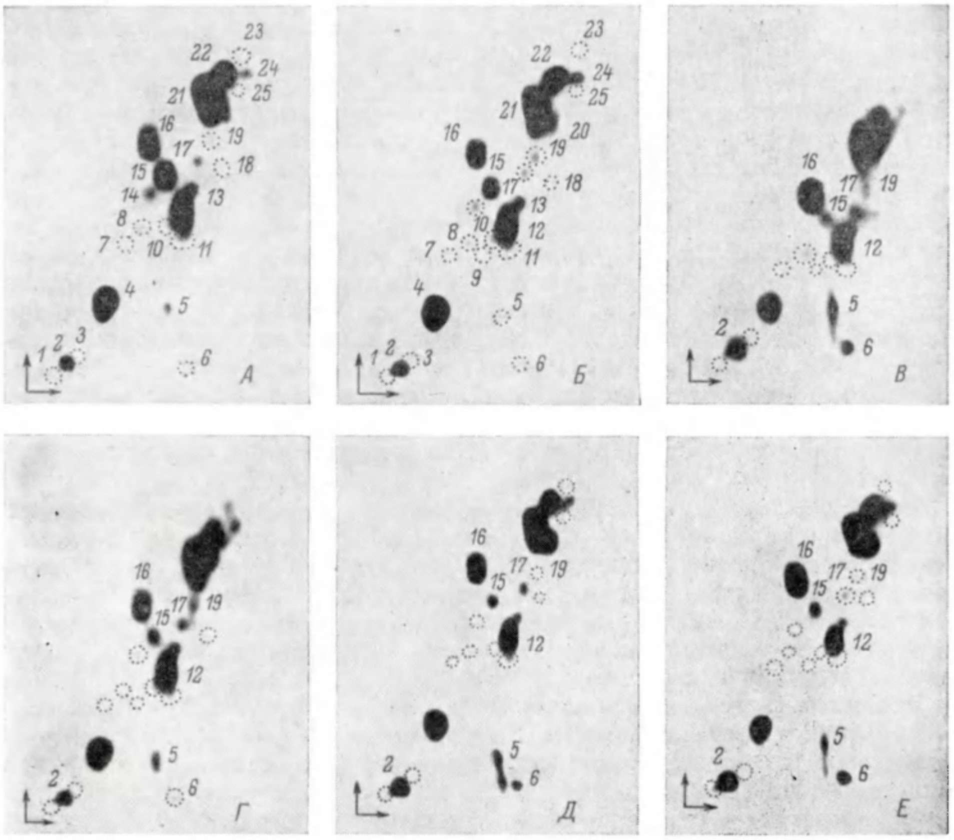

Рис. *А—Е*. Хроматограммы свободных аминокислот из гомогенатов целых голодных имаго *Hyalomta asiaticum*.

А — «чистая» самка; *Б* — «чистый самец»; *В* — самка с *C. burneti*; *Г* — самец с *C. burneti*; *Д* — самка с *D. sibiricus*; *Е* — самец с *D. sibiricus*. *3* — аспарагиновая кислота, *4* — глютаминовая кислота, лизин и орнитин; *5* — аргинин; *7* — серин; *8* — глицин; *9* — аспарагин; *10* — β-аланин; *11* — оксипролин; *13* — гистидин; *14* — треонин; *15* — α-аланин; *19* — тирозин; *21* — валин; *22* — лейцин, изолейцин и метионин; *23* — фенилаланин; *25* — триптофан; *1*, *2*, *6*, *12*, *16*, *17*, *18*, *20* и *24* — неидентифицированные нингидринположительные компоненты. *Снизу вверх* — система хлороформ—метанол—аммиак, *слева направо* — система фенол—вода—аммиак. Направление старта обозначено стрелками.

Учитывая существенные различия в хроматограммах свободных аминокислот в гомогенатах клещей разных полов, хроматографирование «чистых» и инфицированных особей проводилось раздельно для самок и самцов.

У клещей, инфицированных риккетсиями Бернета, для самок характерно резкое уменьшение содержания α-аланина, значительное увеличение интенсивности пятен *5* (аргинин), *16* и несколько меньшее увеличение интенсивности пятна *6* (рис. *В*). У зараженных этим же видом риккетсий самцов отмечены сходные изменения, но они были выражены слабее, чем у самок. У них также наблюдается уменьшение интенсивности пятна *15* (α-аланин) и увеличение пятна *16*, но в отличие от самок последнее не становится больше пятна *12*. Кроме того, немного увеличиваются пятна *2*, *5* (аргинин), *6* и появляется в следовых количествах гистидин (рис. *Г*).

У клещей, зараженных *D. sibiricus*, биохимические сдвиги в организме во многом были сходны с уже описанными для случая с *C. burneti*. У самок (рис. *Д*) отмечено уменьшение размеров пятна α-аланина, увеличение пятна *16* до размеров пятна *12*, некоторое увеличение пятна *17* и уменьшение пятен *2* и *19*. У самцов, зараженных этим же возбудителем, также происходило значительное увеличение пятна *16*, тогда как уменьшение пятна α-аланина было выражено слабее. Кроме того, наблюдалось некоторое увеличение пятен *2*, *5* и *6* (рис. *Е*).

Сопоставление хроматограмм из «чистых» и инфицированных *C. burneti* и *D. sibiricus* клещей свидетельствует о весьма значительных изменениях в содержании α-аланина, нингидринположительного компонента *16*, аргинина и менее ясно выраженных изменений в содержании еще нескольких компонентов. Наиболее ясно выражены увеличение интенсивности пятна *16* и уменьшение пятна *15*. Последнее отмечено для самцов и самок при заражении их как *C. burneti*, так и *D. sibiricus*. Изменения в концентрациях других аминокислот зависели в большей степени от видовой принадлежности возбудителя и от пола инфицированной им особи.

Обнаруженные в наших опытах изменения в содержании свободных аминокислот у зараженных клещей можно объяснить лишь влиянием риккетсий на организм переносчика, так как какие-либо другие различия между контролем и опытом отсутствовали. Важно отметить сходный характер биохимических сдвигов в организме клещей, несмотря на заражение их столь значительно отличающимися видами риккетсий, как *C. burneti* и *D. sibiricus*.

Механизм воздействия риккетсий на метаболизм клещей и насекомых до настоящего времени остается не изученным. О причинах изменений содержания свободных аминокислот в зараженных клещах можно судить лишь косвенно путем сопоставления весьма ограниченных данных об особенностях метаболизма аминокислот у членистоногих и у риккетсий. Известно, что энергетические потребности риккетсий обеспечиваются главным образом за счет окисления ими поступающей извне глютаминовой кислоты (Моульдер, 1965; Паутов и Игумнов, 1968). Одновременно глютаминовая кислота играет весьма важную роль в аминокислотном обмене членистоногих (Гильмур, 1968). Не исключено, что отмеченные нами изменения в содержании свободных аминокислот у клещей-риккетсионосителей могут быть связаны с поглощением возбудителем глютаминовой кислоты. Последнее же в свою очередь нарушает нормальный ход реакций переаминирования и ведет к изменениям в концентрации других аминокислот в организме членистоногого.

Изменения содержания свободных аминокислот в организме насекомых рассматривается в качестве патологического симптома при инфицировании их различными энтомопатогенными микроорганизмами. Примером этого явления могут служить: заражение жука *Melolontha melolontha* бактериями Bacillus fribourgensis (Benz, 1963) или риккетсиями *Rickettsiella melolontha* (Krieg, 1958), полиэдрическая болезнь гусениц тутового шелкопряда (Ishimori a. Muto, 1951) и заражение клопа *Rhodnius prolixus* высокопатогенным штаммом *Trypanosoma rangeli* (Ormerod, 1967).

Нарушения нормальных концентраций свободных аминокислот у клещей-риккетсионосителей, по-видимому, также следует рассматривать в качестве одного из патологических симптомов риккетсиозной инфекции. Последнее, как и уже отмеченные ранее факты изменений в интенсивности газообмена у клещей, зараженных *C. burneti*, свидетельствует о паразитическом характере взаимоотношений патогенных для позвоночных риккетсий с их переносчиками — иксодоидными клещами.

Степень патогенности разных видов риккетсий для членистоногих значительно варьирует. Можно проследить все переходы от случаев гибели насекомых, пораженных энтомопатогенными риккетсиями (Krieg, 1963), до отсутствия каких-либо патологических проявлений при 100% инфицированности популяций клещей риккетсиями рода *Wolbachia* (Балашов, 1967). Патогенные для позвоночных риккетсии, связанные с иксодоидными клещами, вероятно, занимают в этом отношении промежуточное положение. Они не вызывают гибели или существенного снижения жизнеспособности у зараженных клещей, но их нельзя считать безвредными для организма переносчика комменсалами. Вероятно, весьма длительное сосуществование этих риккетсий и клещей привело к тонкой взаимоадаптации у этих двух групп организмов. В результате взаимный вред их сводится до минимального при сохранении паразитического типа взаимоотношений. Риккетсии не причиняют значительных повреждений организму клеща, а защитные реакции последнего не обеспечивают самоочищения от возбудителя.

ВЫВОДЫ

1. Тонкослойной двухмерной хроматографией в слое силикагеля определен состав свободных аминокислот в гомогенатах голодных имаго клещей *H. asiaticum*, инфицированных риккетсиями *C. burneti* и *D. sibiricus* и свободных от этих возбудителей.

2. На хроматограммах выявлено 35 нингидринположительных пятен, из которых идентифицированы следующие 16, отвечающие отдельным аминокислотам или их смеси: аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота вместе с лизином и орнитином, аргинин, серин, глицин, аспарагин, β-аланин, оксипролин, гистидин, треонин, α-аланин, тирозин, валин, лейцин вместе с изолейцином и метионином, фенилаланин, триптофан.

3. У клещей, инфицированных риккетсиями, обнаружено значительное уменьшение содержания α-аланина и увеличение содержания одного из неидентифицированных нингидринположительных компонентов. Кроме того, наблюдались менее резко выраженные изменения концентрации аргинина и некоторых других аминокислот.

Литература

Балашов Ю. С. 1967. Взаимоотношения клещей надсем. Ixodoidea и риккетсий рода Wolbachia. Паразитол. сб. ЗИН АН СССР, 23 : 8—18.

Балашов Ю. С. и Дайтер А. Б. 1963. К вопросу о роли клещей надсем. Ixodoidea при Ку-риккетсиозе. Сообщение V. Локализация и диссеминация риккетсий Бернета в организме клеща Hyalomma asiaticum P. Sch. et E. Schl. Тр. Инст. эпидемиол. и микробиол. им. Пастера. Л., 25 : 135—153.

Балашов Ю. С. и Дайтер А. Б. 1965. Локализация и диссеминация риккетсий Бернета в организме клеща Ornithodoros papillipes Bir. В сб.: Чтения памяти Н. А. Холодковского. Докл., прочитанные на XVII чтениях. Изд. АН СССР. М.—Л. : 34—39.

Балашов Ю. С. и Дайтер А. Б. 1969. Интенсивность газообмена у клещей Hyalomma asiaticum, зараженных риккетсиями Coxiella burneti и Dermacentroxenus sibiricus. Паразитол., 3 (1) : 12—16.

Гилмур Д. 1968. Метаболизм насекомых. Изд. «Мир». М. : 1—230.

Гроховская И. М. и Сидоров В. Е. 1967. Клещи Ixodoidea и Dermacentroxenus sibiricus. В кн.: Биологические взаимоотношения кровососущих членистоногих с возбудителями болезней человека. Изд. «Медицина». М. : 104—125.

Дайтер А. Б. 1963. К вопросу о роли клещей надсемейства Ixodoidea при Ку-риккетсиозе. Сообщение III. Экспериментальное заражение клещей Ixodes ricinus L. и Hyalomma asiaticum Sch. et Schl. риккетсиями Бернета. Тр. Инст. эпидемиол. и микробиол. им. Пастера. Л., 25 : 101—122.

Дайтер А. Б. 1966. Биологические взаимоотношения риккетсий Бернета с кровососущими членистоногими и перспективы изучения паразитологии Ку-риккетсиоза. В сб.: Первое акарологическое совещание (тез. докл.). Изд. «Наука». М.—Л. : 80—81.

Коршунова О. С. 1967. Клещи Ixodidae и Rickettsia sibiricus (Dermacentroxenus sibiricus.) (Полевые и экспериментальные исследования). В кн.: Биологические взаимоотношения кровососущих членистоногих с возбудителями болезней человека. Изд. «Медицина». М. : 86—103.

Марченко Л. А., Ганкина Э. С. и Беленький Б. Г. 1967. Микротонкослойная хроматография аминокислот. Сообщения по анатомии и физиологии древесных растений. Лесотехническая академия. Л. : 85—88.

Моульдер Д. 1965. Биохимия внутриклеточного паразитизма. Изд. «Мир». М. : 1—198.

Паутов В. Н. и Игумнов А. И. 1968. Биология риккетсий (морфология, физиология и изменчивость). Изд. «Медицина». М. : 1—204.

Станюкович А. К. 1966. Предварительные данные изучения свободных аминокислот иксодовых и аргасовых клещей. В сб.: Первое акарологическое совещание (тез. докл.). Изд. «Наука». М.—Л. : 202.

Benz G. 1963. Physiopathology and histohemistry. В кн.: Insect Pathology. An Advanced Treatise. Acad. Press. N. Y. and London, 1 : 299—338.

Carlson B. M. 1961. A chromatographic analysis of the bound amino acids in lamprey muscle (Petromyzontidae). Journ. Exper. Zool., 147 (1) : 43—56.

Ishimori N. and Muto M. 1951. Free amino acids in the blood of the normal and grasserie silkworm by paper chromatography. Journ. sericult. sci. Japan, 20 (2) : 128—131.

Kramer J. P. 1963. Pathogens of vertebrates and plants as pathogens of their acarine and insect vectors. В кн.: Insect Pathology. An Advanced Treatise. Acad. Press. N. Y. and London, 1 : 251—272.

Krieg A. 1958. Weitere Untersuchungen zur Pathologie der Rickettsiose von Melolontha melolontha (L.). Z. Naturforsch., 13b : 374—379.

Krieg A. 1963. Rickettsiae and Rickettsioses. В кн.: Insect Pathology. An Advanced Treatise. Acad. Press. N. Y. and London, 1 : 577—617.

Micks D. W. and Gibson F. J. 1957. The characterization of insects and ticks by their free amino acid patterns. Annals Entomolog. Soc. America, 50 (5) : 500—505.

Ormerod W. E. 1967. The effect of Trypanosoma rangeli on the concentration of amino acids in the haemolymph of Rhodnius prolixus. Journ. invertebrate pathology, 9 (2) : 247—255.

Philip C. B. 1963. Recent advances in knowledge of tick-associated rickettsialike organism. Journ. Egyptian Publ. Health Assoc., 38 (2) : 61—99.

Weyer F. 1960. Biological relationschips between lice (Anoplura) and microbial agents. Annual Rev. Entomol., 5 : 405—420.

THE EFFECT OF INFESTATION WITH THE RICKETTSIA COXIELLA BURNETI AND DERMACENTROXENUS SIBIRICUS ON THE CONTENT OF FREE AMINO-ACIDS IN THE TICK HYALOMMA ASIATICUM

J. S. Balashov, A. B. Dayter and A. K. Stanjukovich

SUMMARY

The content of free amino-acids in homogenates of unfed adults of *Hyalomma asiaticum* was studied by means of fine-layer two-dimensional chromatography in silica gel KCK. Individuals infested with rickettsia C. burneti and D. sibiricus and those free of them were examined. 25 nynhydrin-positive spots were recognized on chromatogrammes, 16 of which corresponded to the following amino-acids: aspartic acid, glutamine acid together with lysine and ornithine, argenine, serine, glycine, asparagine, β-alanine, hydroxyproline, hystidine, threonine, α-alanine, tyrosine, valine, leucine together with isoleucine and methionine, phenylalanine, tryptophan. Between males and females were revealed constant differences in the content of free amino-acids. It was established that in ticks infested with rickettsia the content of α-alanine is considerably decreased, the content of one of non-identified nynhydrine-positive components is increased and concentrations of some other amino-acids are slightly changed.